

THESIS

MUNICH

1966

Eine neue Methode
zur quantitativen Bestimmung
von Xanthin und Hypoxanthin
im Urin

ULRICH HÖGG

München

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus der
Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

EINE NEUE METHODE ZUR
QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON XANTHIN UND HYPOXANTHIN
IM URIN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in
der gesamten Medizin verfaßt und einer hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
U L R I C H H Ö G G
aus Stettin

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München:

Referent:	Prof.Dr. N. Zöllner
Korreferent:	Prof.Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof.Dr. M. Kiese
Tag der münd- lichen Prü- fung:	20. Dezember 1966

Fotodruck: Mikrokopie GmbH. München. Bruderstr. 9

INHALTSÜBERSICHT

I Einleitung	Seite 5
II Grundlagen der quantitativen Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin	7
1) UV - Absorption	7
2) Xanthinoxydase	8
3) Uricase	9
4) Beständigkeit und Löslichkeit von Oxypurinen	9
5) Dowex 50 H ⁺ Kationenaustauscher	10
6) Neutralisieren und Einengen von Ammoniaklösungen	10
III Versuche zur Oxypurinbestimmung in harnsäurehaltigen Lösungen.	11
1) Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin in reinen Lösungen	11
2) Der Einfluß von Harnsäure auf Xanthinoxydase	11
3) Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin im Urin nach Jørgensen und Poulsen	14
4) Urinabsorption im kurzwelligen Ultraviolett - Licht	16
5) Versuche zur nicht enzymatischen Harnsäureoxydation.	19
6) Diskussion zu den Versuchen zur Xanthin- und Hypoxanthin - Bestimmung	21

IV Versuche zu einer neuen quantitativen	Seite 23
Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin	
im Urin.	
1) Reagentien	23
2) Einzelschritte	24
a) Elutionskontrolle mit Fraktions-	24
sammler	
b) Waschen des Austauschers	24
c) Beschreibung der Säule	24
d) Vorbehandlung von Substanzgemischen bzw. Urin	25
e) Elutionsvorgang	25
f) Einengen von NH_3 - Eluat	25
g) Enzymatische Bestimmung des Eluates	26
h) Berechnung	27
i) Harnsäurebestimmung	28
3) Prüfung der Methode	29
a) Auswaschen der Harnsäure	29
b) Elution von Xanthin und Hypoxanthin	30
c) Eluat- und Enzymkonzentrationen	34
d) Absetzenlassen, Zentrifugieren	34
e) Spektrum von 2 % NH_3 - Eluat	36
f) Kontrolle der Methode	36
4) Zusammenfassende Darstellung der Methode	37
5) Ergebnisse	39
a) Quantitative Werte aus reiner Lösung und Urin	39
b) Normalwerte für 24 - Stunden - Urine	39

c) Stündliche Ausscheidung von Xanthin und Hypoxanthin	Seite 40
d) Xanthin- und Hypoxanthinaus- scheidung nach Ribonucleinsäu- re - Gabe	41
6) Diskussionsin der neuen Methode	42
V Tabellen	44
VI Zusammenfassung	47
VII Literaturangaben	48

I EINLEITUNG

Purine sind Bestandteile der Nucleinsäuren und vieler Cofermente. Zur Erforschung von Zellstoffwechselstörungen bei bösartigen Geschwulsten, Leukämien und familiären Erkrankungen ist die Kenntnis des Purinstoffwechsels von großem Wert. Dazu einen kleinen Beitrag zu leisten ist die Aufgabe dieser Arbeit.

Die ursprüngliche Fragestellung galt dem Purinnucleotidgehalt des Blutserums. Zu diesem Thema hatte S. Thannhauser 1921 und 1955 (1,2) Arbeiten veröffentlicht, die 10 - 20 mg% Purinnucleotide im Blutserum angeben. Wir entwickelten ein dünnenschichtchromatographisches Verfahren zur Nucleotidauf-trennung (3,4) aus Ribonucleinsäurehydrolysaten. Es gelang aber nicht, aus verschiedenen Serumextrakten darstellbare Nucleotidmengen zu isolieren. Dazu ergaben neuere Literaturstudien (5 - 11), daß der Serumnucleotidgehalt unter 100 µg/% liegt. Die im Serum vorhandenen Enzymkonzentrationen (12,13) an Phosphoglycerokinase, Pyruvatkinase, Apyrase (14) und Phosphatasen (15) reichen aus, den Nucleotidgehalt des Serums in weniger als einer Minute abzubauen.

Purinnucleotide werden über Guanin zu Xanthin bzw. über Adenin zu Hypoxanthin und weiter zu Harnsäure abgebaut. 3 % des Xanthin und Hypoxanthins werden vom Körper unverändert ausgeschieden. Diesem Teil des Purinstoffwechsels gilt die endgültige Fragestellung dieser Arbeit.

Die ersten quantitativen Bestimmungen von Xanthin und Hypoxanthin gehen auf Salomon und Krüger 1898 zurück (16); sie isolierten die Substanzen mit Fällungsmethoden aus 10 000 l Urin.

Mit modernen biochemischen Methoden gelang es, die Spezifität und quantitative Ausbeute dieser Bestimmungen zu verbessern. Cole u. a. (17) wenden dabei 1931 erstmals Xanthinoxidase an.

Weissmann (18,19) gelingt 1956 eine halbquantitative Auftrennung aller Purinbasen des Urins. Er arbeitet mit kombinierten säulenchromatographischen, papierchromatographischen und spektrophotometrischen Verfahren.

1947 schon beschreibt Kalckar (20) eine Methode, Xanthin und Hypoxanthin mit Xanthinoxidase und Uricase in reinen Lösungen spektrophotometrisch zu bestimmen.

Jørgensen und Poulsen (21) wenden diese Methode 1955 auf den Urin an. Sie finden, allerdings in stark verdünntem Urin, befriedigende quantitative Ausbeute. Die Arbeit von Jørgensen und Poulsen ließ eine zuverlässige quantitative Methode erwarten. Daher war als Aufgabe unserer Arbeit eine breite Anwendung dieser Methode vorgesehen. Aber der Ablauf unserer Forschungen nahm einen anderen Gang.

II GRUNDLAGEN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON XANTHIN UND HYPOXANTHIN

1. Ultraviolett - Absorption.

Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure absorbieren das Licht im Bereich von 250 - 300 $m\mu$. Die Extinktion ist dabei jeweils proportional der Konzentration.

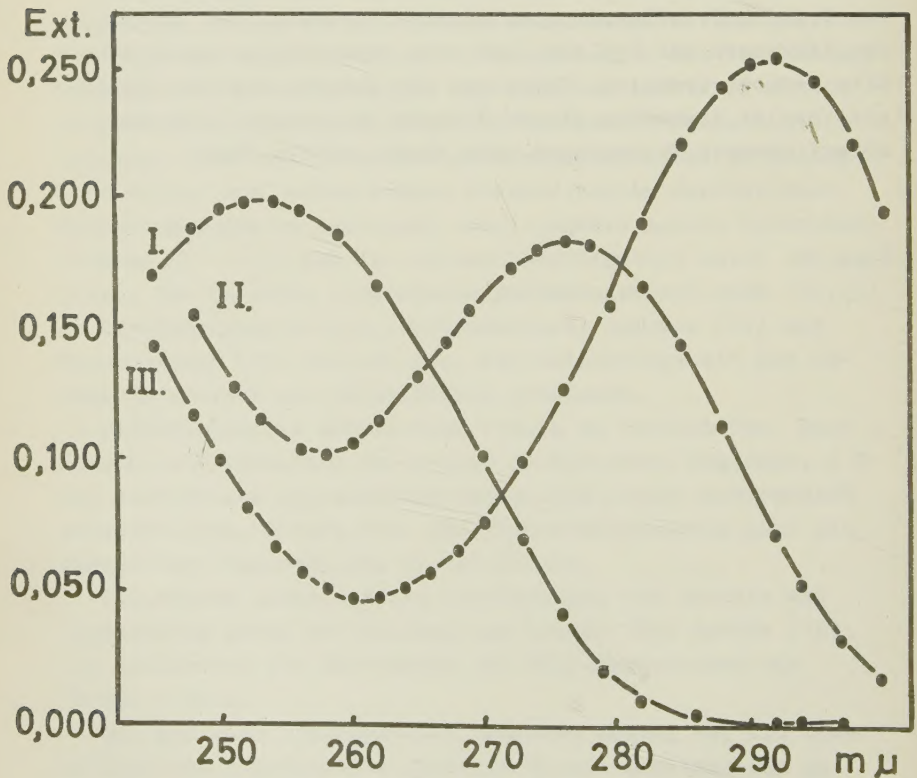


Abbildung 1: Spektren von Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure in 0,06 n Glycinpuffer, pH 9,3. I. Hypoxanthin 20 $\mu\text{mol/l}$; II. Xanthin 20 $\mu\text{mol/l}$; III. Harnsäure 20 $\mu\text{mol/l}$.

Die Spektren sind pH-abhängig. Das Maximum von Xanthin z. B. wandert von pH 1,5 = 265 μ über pH 9,0 = 276 μ nach pH 14 = 284 μ .

Der Extinktionsquotient zweier Wellenlängen einer reinen Lösung (z. B. für Harnsäurelösung $\frac{E_{292}}{E_{279}}$) ist bei unverändertem pH konstant, unabhängig von der Konzentration. Er kann als Reinheitsmesser für die gelöste Substanz gelten.

Wir haben unsere UV - Meßwerte mit einem Spektralphotometer von Zeiss, Typ PMQ II - M4Q III gewonnen.

Alle Messungen wurden mit Quarzküvetten 1 x 1 x 4 cm, Wasserstofflampe und, wenn möglich, mit 0,2 mm Lichtspalt bei Raumtemperatur ausgeführt.

Extinktionen bis 0,250 sind mühelos auf $\pm 0,001$ genau ablesbar. Extinktionen bis 1,200 kann man unter den obigen Bedingungen auf 0,000 zurückstellen; dadurch lassen sich auch kleine Differenzen hoher Extinktionen relativ genau messen.

2. Xanthinoxydase.

Xanthinoxydase ist ein eisen- und molybdänhaltiges Flavoprotein. Sie wird aus Milch gewonnen. In Gegenwart von O_2 oxydiert Xanthinoxydase Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure. Außerdem reagiert sie mit zahlreichen anderen Purinen, Aldehyden, Pteridinen und Pyrimidinen (22 - 24). Im Urin sind davon bekannt: Adenin, 1 - Methylxanthin und Xanthopterin.

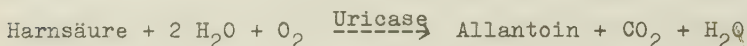
Xanthinoxydase hat ihr pH - Optimum (25) bei 8,2; bei pH 9,2 zeigt sie etwa 25 % weniger Aktivität. Durch zahlreiche Purine und Pteridine wird sie gehemmt, im Urin u. a. durch Guanin.

20 mg des im Handel erhältlichen Xanthinoxydasepräparates (von Boehringer Sohn, Ingelheim a. R.) können mit 35 Teilen 0,2 m Phosphatpuffer verdünnt werden. Es zeigt dann

in 3 ml Hypoxanthin 20 $\mu\text{mol/l}$, pH 8,2, für 10 μl Oxydase-lösung Δ_E 292 ($0,015 \pm 0,001$) pro Minute als mittlere anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit. Die Eigenextinktion beträgt dabei um 0,002.

3. Uricase.

Uricase oxydiert Harnsäure und 8 - Aminoxanthin (26), das nicht natürlich vorkommt; sie kann also im Organismus als streng spezifisch gelten (27). Harnsäure wird zu Allantoin, das praktisch keine UV - Absorption zeigt, oxydiert.



Durch Alkalisieren auf pH 11,0 wird Uricase völlig zerstört; durch Schwermetallionen wird sie gehemmt. Ihr pH - Optimum liegt zwischen 9,0 - 9,3. Uricase ist empfindlicher gegen pH - Veränderungen als Xanthinoxydase.

Das im Handel erhältliche Uricasepräparat (Uricase Loewens, Kopenhagen) wird für unsere Zwecke in 0,5 ml 0,06 n Glycinpuffer pH 9,0 gelöst. 10 μl davon ergeben in 3 ml Harnsäure 20 $\mu\text{mol/l}$, pH 9,0 - Δ_E 292 0,017/ min als mittlere anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit. Die Eigenextinktion liegt dabei um $0,005 \pm 0,001$.

4. Beständigkeit und Löslichkeit der Oxypurine.

Für unsere Untersuchungen ist wichtig, daß Xanthin und Hypoxanthin bei 20° in 0,1 n HCl und 0,01 n NaOH über Wochen beständig sind. Harnsäure wird unter diesen Bedingungen langsam oxydiert (28).

In n NaOH wird Harnsäure innerhalb von Stunden durch O_2 oxydiert, dabei entsteht wahrscheinlich "Oxy-acetylen-diurein-carbonsäure", eine Vorstufe des Allantoins.

Die Löslichkeit in Wasser bei 20° C beträgt 5,3 m Mol/l für Hypoxanthin, 3,3 m Mol/l für Xanthin und 0,15 m Mol/l für Harnsäure.

5. Dowex 50 H⁺ Kationenaustauscher.

Dowex 50 H⁺ ist ein stark saures Polystyrolharz mit -SO₃⁻ H⁺ Gruppen. Bei saurem pH werden Xanthin (pK_{Base} ~ 0,8) und Hypoxanthin (pK_{Base} ~ 1,98) gegen die Protonen der dissoziierten -SO₃⁻ Gruppen ausgetauscht und so in ihrer Nähe festgehalten.

Harnsäure zeigt keinerlei Affinität zu Dowex 50 H⁺.
Die Austauschreaktion



folgt dem Massenwirkungsgesetz: Steigende H⁺ bzw. NH₄⁺ Konzentration oder Durchflußmenge beschleunigen daher die Passage von Xanthin und Hypoxanthin durch die Dowex SO₃⁻ H⁺ - Säule.

HY = Hypoxanthin

X = Xanthin

Dowex SO₃⁻ H⁺ hat eine Kapazität von 4,9 mval (Kationen)/g (Trockengewicht); sie sinkt unterhalb pH 1,5 langsam ab. Bei pH 0,8 beträgt sie nur noch 3,0 mval.

6. Neutralisieren und Einengen von Ammoniaklösungen.

Man kann Xanthin und Hypoxanthin u. a. mit 1,7 % - 10 % NH₃ (18,29,30) aus Dowex 50 H⁺ eluieren.

Ammoniak läßt sich aus wässrigen Lösungen austreiben durch Unterdruck, durchströmendes Gas oder Kochen.

Die Untersuchung dieser Möglichkeiten zeigte, daß

- 50 ml 10 % NH₃, kräftig von N₂ durchströmt nach 4 Stunden fast neutral war.
- 50 ml 5 % NH₃ im Wasserstrahlvakuum nach 5 1/2 Stunden pH 13 zeigte und auf ca. 39 ml eingengt war.
- 50 ml 5 % NH₃ nach 18 - 20 Minuten Kochen neutral und auf 16 - 19 ml eingengt war.

III VERSUCHE ZUR OXYPURINBESTIMMUNG IN HARNSÄUREHALTIGEN LÖSUNGEN

1. Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin in reinen Lösungen.

Wir bestimmten Xanthin und Hypoxanthin nach Kalckar (20) in je drei Parallelversuchen; dadurch konnten wir unsere Reagentien, Arbeitsgenauigkeit, Geräte und theoretischen Grundlagen einfach überprüfen.

Xanthinoxidase wirkte in Glycylglycin bei pH 8,2, Uri-case nach Zugabe von Glycin bei pH 9,3. Zur Extinktionsmessung wurden alle Proben auf pH 9,3 eingestellt. Enzym- und Pufferleerwert wurden abgezogen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 wiedergegeben. Die eingetragenen Punkte sind die Mittelwerte von je 3 Vergleichswerten, deren mittlerer Fehler bei $\pm 0,001$ ($\pm 0,000 - 0,003$) liegt.

2. Der Einfluß von Harnsäure auf Xanthinoxidase.

Aus III, 1 folgt unter anderem, daß Xanthin und Hypoxanthin vielleicht bei vorhandener Harnsäure im Urin bestimmt werden könnten.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden folgende Versuche durchgeführt:

Es wurden 20 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin bzw. Hypoxanthin in 1 : 10 und 1 : 30 verdünnter Harnsäurelösung mit Xanthinoxidase untersucht. Die Harnsäure - Stammlösung enthielt wie Urin 750 mg Harnsäure/l. Xanthinoxidase, 20 μl / 3 ml wirkte bei pH 8,2 75 Minuten ein. Zwei 1 : 10 verdünnte Urine wurden genauso untersucht. Der Leerwert enthielt entsprechend verdünnte Harnsäure, bzw. Urin und H_2O statt Xanthinoxidase.

Abbildung 2: Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin in reiner Lösung nach Kelcekar (20).
 --- 20 $\mu\text{mol/l}$ Xanthin; - + - 20 $\mu\text{mol/l}$ Hypoxanthin; I reine Xanthin- bzw. Hypoxanthinlösung
 in pH 9,3; II nach Xanthinoxidasegabe: aus Xanthin bzw. Hypoxanthin entstandene Harnsäure;
 III nach Uricasezugabe: aus Harnsäure entstandenes Allantoin.

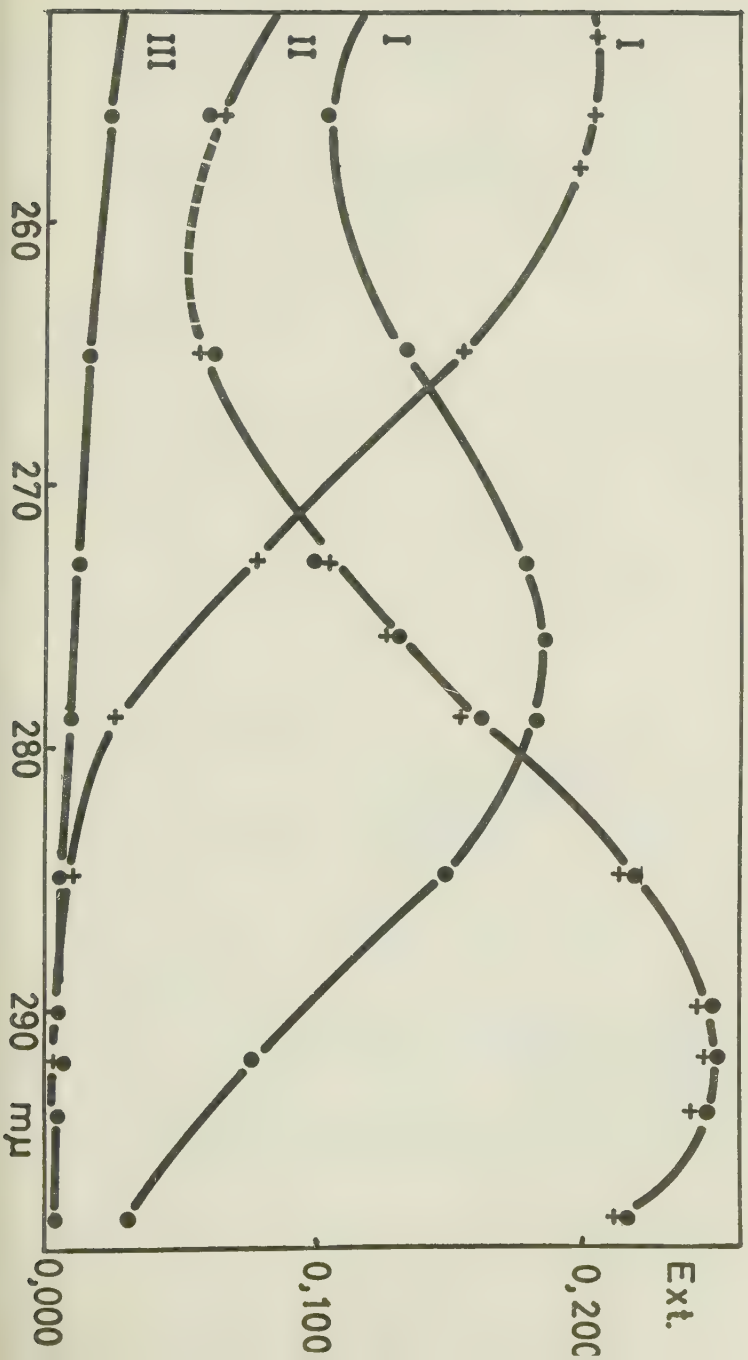


Tabelle 1: Der Einfluß von hohen Harnsäurekonzentrationen auf die Xanthin- bzw. Hypoxanthinoxydation mit Xanthinoxydase.

Harnsäure 750 mg/l und normaler Urin wurden 1 : 10 und 1 : 30 verdünnt.

Der Sollwert $\Delta E \frac{292}{279}$ wurde in reiner Xanthin- bzw. Hypoxanthinlösung gefunden (s. Abb. 2).

	$\Delta E \frac{292}{279}$	$\Delta E \frac{292}{279}$	$\Delta E \frac{292}{279}$ (Sollwert)
1. Harnsäure 1 : 10 mit 20 umol/l Xanthin	0,027	0,30	- 7,9
2. " " " " Hypoxanthin	0,023	0,28	1,95
3. " 1 : 30 " " Xanthin	0,222	1,44	- 7,9
4. " " " " Hypoxanthin	0,215	1,44	1,95
5. Urin (R. W.), 1 : 10, ohne Zusatz	0,034	34:1	-
6. " (Z. M.), " "	0,003	3:1	-

Die Versuche 1, 2, 5 und 6 wurden je einmal wiederholt; in die Tabelle wurden die Mittelwerte der Extinktionsänderung durch Xanthinoxydasezugabe eingetragen.

3. Zur Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin im Urin nach Jørgensen und Poulsen.

Jørgensen und Poulsen (21) oxydieren die ursprüngliche Harnsäure im Urin mit Uricase; sie zerstören diese durch alkalisieren auf pH 13; dann verfahren sie weiter wie Kalckar (20) (s. o.).

Ihre Versuchsanordnung ist folgende (auf 6 ml / Reagenzglas berechnet):

a) Urin	400 μ l
b) 0,6 n Glycinpuffer; pH 9,3	5200 μ l
c) Uricase	100 μ l

1 Stunde warten

d) 1,6 n NaOH	(1560 μ l)	1500 μ l
---------------	----------------	--------------

15 Minuten warten

e) 1,6 n HCl	1600 μ l
f) 0,6 n Glycylglycinpuffer pH 8,2	1200 μ l
g) Xanthinoxidase	80 μ l

1 Stunde warten

h) 0,6 n NaOH	(1,6 n NaOH)	400 μ l
i) 0,6 n Glycinpuffer pH 9,3		1600 μ l

Davon 6 ml in neues Reagenzglas geben, 40 μ l Uricase zusetzen = B

Zum Rest 40 μ l H₂O zusetzen = A

Nach 1 Stunde A gegen B ablesen bei 292 und 279 m μ , mit einem Teil des Reagenzglasinhaltes werden die Küvetten vorgespült.

Uricaseleerwert in 0,06 n Glycinpuffer pH 9,3 bestimmen (= U_L)

Berechnung: $A - (B + U_L) = -\Delta_E$ durch Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin.

Der Ausgleich des Uricasevolumens in A wird von Jørgensen und Poulsen nicht angegeben, dürfte aber bei der hohen Extinktion von 1 : 30 verdünntem Urin (0,700) mehr als 10 % der Xanthin-Hypoxanthin-Werte ausmachen.

Jørgensen und Poulsen arbeiten bei den Schritten a) bis i) nicht mit einem gemeinsamen Ansatz, sondern mit zwei getrennten, genau gleichen Ansätzen. Versuch 1 und 2, Tab. 2, wurden genau nach obiger Anordnung ausgeführt. Bei Versuch 3 - 7, Tab. 2, wurden für die Schritte d) und h) die Angaben in Klammern verwendet, um die von Jørgensen und Poulsen geforderten pH-Werte einhalten zu können.

Tabelle 2:

Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin mit der Methode von Jørgensen und Poulsen.

	$-\Delta_E 292$	$-\Delta_E 279$	$\Delta_E \frac{292}{279}$	$\Delta_E \frac{292}{279}$ (Sollwert)
1. Urin (R. W.) 1 : 30	0,018	0,0085	2,12	1,62
2. " " "	0,023	0,013	1,77	"
3. " " 1 : 15	0,044	0,030	1,47	"
4. Urin (Z. M.) 1 : 30	0,034	0,018	1,89	"
5. " " "	0,039	0,021	1,85	"
6. Urin (N. W.) 1 : 30	0,035	0,014	2,50	"
7. " " "	0,042	0,023	1,83	"

Tabelle 2 gibt die Ergebnisse von insgesamt 16 Urinbestimmungen nach Jørgensen und Poulsen wieder. Es sind die Mittelwerte von je zwei gleichzeitigen Versuchen eingetragen. Die Extinktionsänderungen sind durch die Bestimmung der aus Xanthin und Hypoxanthin entstandenen Harnsäure mit Uricase bedingt. $\Delta_E \frac{292}{279}$ würde in reiner Xanthin- und Hypoxanthinlösung 1,62 betragen (s. Abb. 2).

4. Urinabsorption im kurzwelligen Ultraviolett - Licht.

Die Ergebnisse mit Jørgensens und Poulsens Methode zeigen Parallelversuche die bis zu 20 % voneinander abweichen. Die Quotienten $\Delta_E \frac{292}{279}$ ergeben Werte bis zu 2,50 statt 1,62.

Um die Ursachen dieser Ungenauigkeit zu ergründen, haben wir die Urinextinktion im kurzwelligen Ultraviolett - Licht genauer untersucht.

Verdünnter Urin pH 9,0 verursacht von 250 - 300 m μ sehr hohe Extinktionen, siehe Abb. 3, Kurve I.

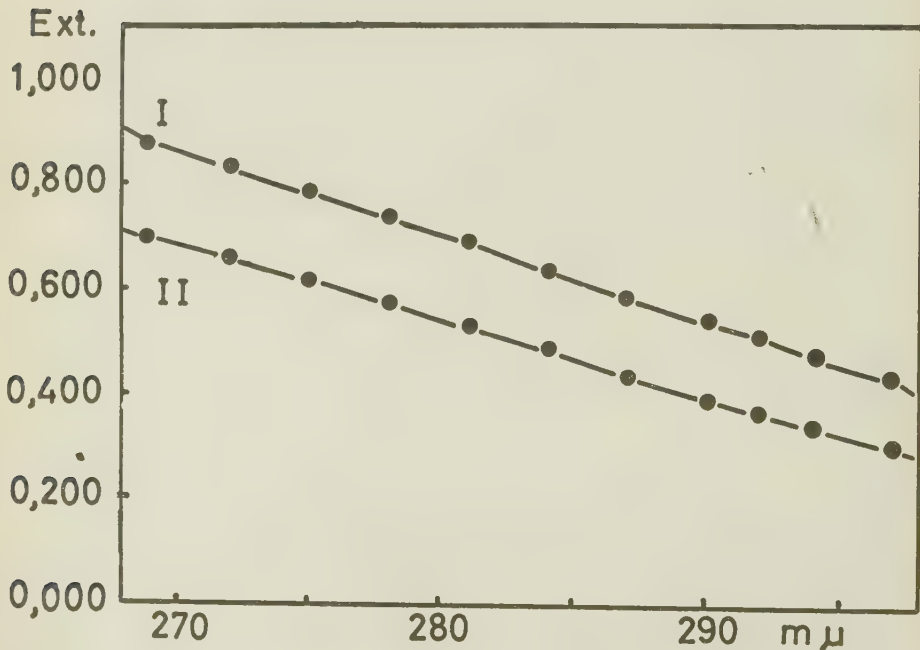


Abbildung 3: Grundextinktion von Urin und Urineluat.
I. 2 % NH_3 - Urineluat 1 : 10, pH 9,0; II. Harnsäurefreier Urin 1 : 50, pH 9,0. Die Urinkonzentrationen sind bezogen auf 1500 ml Urin/Tag. Die Punkte geben die Mittelwerte von je drei Versuchen wieder mit Proben von je drei 24 - Stunden - Urinen.

Bei 292 m μ verhält sich die Harnsäureextinktion zur Grundextinktion zur Xanthin und Hypoxanthinextinktion (als Harnsäure) wie:

$$32 : 21 : 1$$

Also entspricht einer Δ_E 292 von 0,050 durch Xanthin und Hypoxanthin eine Grundextinktion von etwa 1,050.

Die Grundextinktion um 292 m μ dürfte im wesentlichen verursacht sein durch Proteine, aromatische Aminosäuren, Pteroylglutaminsäure, Purine, Steroide, Flavine und Hämoglobinabbauprodukte.

Um auf der hohen Extinktion von verdünntem Urin die relativ kleinen Extinktionsänderungen bei der Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin zu messen, müßte die Gesamtextinktion über die gesamte Versuchsdauer zuverlässig konstant bleiben.

Dies wurde untersucht an 1 : 30 verdünntem Urin, der mit reichlich Uricase versetzt war und über 21 Stunden beobachtet wurde.

Um zuverlässige Ergebnisse zu bekommen, wurde der Urin aufgekocht, pH 9,3 eingestellt, die Küvetten sehr gründlich gereinigt und während des Versuches bedeckt.

Um die Extinktionsänderungen genau zu messen, benutzten wir einen unveränderlichen, hohen Leerwert: Trichloressigsäure, Sublimat, FeSO₄ und CuSO₄ erwiesen sich als ungeeignet. Zufriedenstellend war Xanthin 60 μ mol/l in 0,01 n NaOH in garantiert sauberen Küvetten.

Als Ergebnis von 2 Versuchen fanden wir, daß die Harnsäure nach 40 Minuten zerstört ist. Zwischen 70 bis 190 Minuten fanden wir $-\Delta_E$ 292 0,017 bzw. 0,018 und von 190 Minuten bis 21 Stunden $-\Delta_E$ 292 0,018 bzw. 0,026.

6. Versuche zur nichtenzymatischen Harnsäureoxydation.

Urin ist nach der enzymatischen Harnsäureoxydation nicht optisch ruhig. Um diese Unruhe zu untersuchen, haben wir versucht, Harnsäurelösung ohne Enzyme vorsichtig zu oxydieren. Dies geschieht einfach durch O_2 in NaOH (28).

750 mg Harnsäure/l in n NaOH wurde unter verschiedenen Bedingungen verarbeitet. Anschließend wurde die Lösung zur spektrophotometrischen Auswertung bei 294,5 $m\mu$ jeweils 1 : 30 mit 1 n NaOH verdünnt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Harnsäureoxydation in 1 n NaOH

Zeitdauer

der

Reaktion	0	15	30	60	120	180	360 Min.	20 Std.
Versuch 1	1,692	1,532	1,418					
Versuch 2	1,745	1,547	1,515			1,080		
Versuch 3	1,580	1,072	0,582	0,207				
Versuch 4	1,450	1,038		0,465	0,156	0,080	0,014	0,013

Versuch 1: Harnsäurelösung gekocht

Versuch 2: " magnetisch gerührt

Versuch 3: " im Mixgerät unter O_2 geschlagen

Versuch 4: " magnetisch unter O_2 gerührt

Durch Rühren in n NaOH unter Sauerstoff werden 750 mg Harnsäure/l in 6 Stunden völlig oxydiert; die Oxydation kann durch pH - Änderung beendet werden. (Evtl. wichtig für Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin).

In gleicher Weise behandelter Urin ist nach 15 Stunden optisch ruhig; er bleibt es für 10 Stunden weiteran

Rührens. Wahrscheinlich sind auch andere leichtoxydierbare Substanzen weitgehend oxydiert.

Leider ließ die enzymatische Untersuchung von oxydierter Harnsäurelösung auf Hemmung von Xanthinoxidase schließen (s. Tabelle 4).

Harnsäure 750 mg/l wurde unter O_2 12 Std. in n NaOH gerührt. Anschließend wurde in der verdünnten Lösung Xanthin und Hypoxanthin bestimmt. (Wie Kapitel III, 2 s. o.).

Tabelle 4: Der Einfluß hoher Konzentrationen chemisch oxydierter Harnsäure auf die Xanthin- bzw. Hypoxanthinoxidation mit Xanthinoxidase.

	$\Delta_{E\ 292}$	$\Delta_{E\ \frac{292}{279}}$	$\Delta_{E\ \frac{292}{279}}$ (Sollwert)
1. Harnsäure ox. 1 : 10 + 20 μ mol/l Xanthin	0,161	0,88	- 7,9
2. Harnsäure ox. 1 : 10 + 20 μ mol/l Hypoxanthin	0,005	0,10	1,95
3. Harnsäure ox. 1 : 30 + 20 μ mol/l Xanthin	0,257	1,58	- 7,9
4. Harnsäure ox. 1 : 30 + 20 μ mol/l Hypoxanthin	0,249	1,59	1,95

750 mg/l oxydierte Harnsäure wurden 1 : 10 und 1 : 30 verdünnt. Der Sollwert $\Delta_{E\ \frac{292}{279}}$ wurde in reiner Xanthin- bzw. Hypoxanthinlösung gefunden (s. Abb. 2).

7. Diskussion zu den Versuchen zur Xanthin- und Hypoxanthin - Bestimmung.

Die Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin in reinen Lösungen (s. III, 1) ist quantitativ. Sie zeigt, daß die verwendeten Reagentien und Geräte zuverlässig arbeiten; das ist für die Beurteilung der nachfolgenden Versuche wichtig.

Die Reaktion von Xanthinoxydase mit Xanthin und Hypoxanthin in Gegenwart großer Harnsäuremengen verläuft nicht quantitativ (s. Tab. 1); offenbar, da die Konzentrationsgleichgewichte ungünstig sind.

Es ist bemerkenswert, daß sich chemisch oxydierte Harnsäure ähnlich verhält (s. Tab. 4), obwohl sie an der Xanthinoxidasereaktion nicht teilhat. Die Störung schließt Xanthin- und Hypoxanthin - Bestimmung in Anwesenheit hoher Konzentrationen oxydierter Harnsäure aus (s. Tab. 4,1 u. 2); auch in kleineren Konzentrationen ist sie nicht kontrollierbar (s. Tab. 4,3 u. 4).

Die Methode von Jørgensen und Poulsen (s. III, 3) arbeitet nach unseren Ergebnissen nur halbquantitativ. Wir haben versucht zufällige Fehler auszuschalten. Dazu haben wir gleiche Versuchsansätze möglichst spät voneinander getrennt, kleinste Volumenunterschiede ausgeglichen und die pH - Werte korrigiert.

Unzulänglichkeit der Enzymkonzentration ist unwahrscheinlich, da bei 1 : 15 verdünntem Urin die Ergebnisse eher besser als schlechter zu sein scheinen (s. Tab. 2, R. W. 1 : 15).

Trotzdem sind unsere Ergebnisse mit Jørgensens und Poulsens Methode unbefriedigend: Durch Abweichungen der Parallelversuche bis zu 20 % und Schwankungen der Grundextinktion, die sich im Quotienten $\Delta_E \frac{292}{279}$ äußern (1,47 - 2,50 statt 1,62). Dies läßt sich durch die unruhige hohe UV - Absorption weit-

gehend erklären (s. III, 5).

Unsere Ergebnisse widersprechen denen von Jørgensen und Poulsen nicht, denn jene finden nur in 1 : 50 - 1 : 150 verdünntem Urin bei 3 - 6 fach erhöhten Xanthin- und Hypoxanthin - Konzentrationen quantitative Ergebnisse. Sie machen keine Angaben über die Reinheit ihrer Werte mit Hilfe des Quotienten $\Delta_E \frac{292}{279}$. Daher stellen wir fest, daß Jørgensens und Poulsens Methode zur quantitativen Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin in normalem Urin nicht geeignet erscheint.

Da auch die chemische Harnsäureoxydation nicht zur Lösung unserer Schwierigkeiten führt, mußten wir eine neue Methode erarbeiten, um Xanthin und Hypoxanthin quantitativ im Urin zu bestimmen. Ziel dieser Methode war es, Xanthin und Hypoxanthin in optisch ruhigem, harnsäurefreiem Urineluat bei niedriger Grundextinktion zu bestimmen.

IV VERSUCHE ZU EINER NEUEN QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON XANTHIN UND HYPOXANTHIN IM URIN.

Xanthin und Hypoxanthin lassen sich an Dowex 50 H⁺ Kationenaustauscherharz von Harnsäure trennen (18,29,30,32 - 34). Auf diesem Befund haben wir eine neue Methode zur Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin im Urin aufgebaut.

1. Reagentien

- a) 0,6 n Glycinpuffer pH 9,0:
20,2 g Glycin, 15,6 g NaCl und 35 ml n NaOH ad 500 ml mit aqua dest. auffüllen. Der Puffer wird über Chloroform im Kühlschrank gelagert.
- b) Xanthinoxydase: 20 mg Xanthinoxydase, Boehringer 1 : 35 mit 0,2 m Phosphatpuffer verdünnen.
Aktivität s. II, 2.
- c) Uricase: 1 Ampulle Uricase Loewens in 0,5 ml 0,06 n Glycinpuffer pH 9,0 lösen.
Aktivität s. II, 3.
- d) Xanthinstammlösung: $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Xanthin in 0,01 n NaOH.
- e) Hypoxanthinstammlösung: $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Hypoxanthin in 0,01 n NaOH.
- f) Harnsäurestammlösung: 750 mg/l Harnsäure in 0,01 n NaOH.
- g) Kationenaustauscher Dowex 50W H⁺, X 8, 100 - 200 mesh von Serva Heidelberg.
- h) 5 n Salzsäure p. a.
- i) 25 % Ammoniaklösung p. a.

2. Einzelsschritte

a) Elutionskontrolle mit Fraktionssammler

Um die Elutionsvorgänge zu kontrollieren, sammelten wir unsere Eluate im Fraktionssammler in 4 - 10 ml Portionen. Spektrophotometrische Messungen erfolgten ohne weitere Bearbeitung. Es wurde jeweils bei der Wellenlänge des Maximums der gesuchten Substanzen die Extinktion gemessen.

b) Waschen des Austauschers

Das Dowex 50 - Harz wurde vor Gebrauch mit folgenden Reagentien unter ständigem Rühren gewaschen:

2 x 2 n NaOH

3 x aqua dest.

3 x 5 n HCl

3 x aqua dest.

Je das 10 - fache des Austauschergewichtes wirkte je 5 Minuten auf den Austauscher ein. Der Austauscher wurde dann in H^+ - Form in Wasser bis zu 4 Wochen gelagert.

c) Beschreibung der Säule

Eine 20 cm lange Säule mit 0,8 cm Innendurchmesser erwies sich als günstig für unsere Zwecke. Sie wird unten mit Glasnagel und Glaswolle abgedichtet und 10 cm hoch ($\pm 0,5$ cm) mit Dowex 50 H^+ beschichtet; auf den Austauscher wird 0,5 cm hoch Glaswolle geschichtet.

Oben an die Säule wird ein 100 - 200 ml Schütteltrichter mit einem kräftigen Gummischlauch luftdicht angeschlossen.

d) Vorbehandlung von Substanzgemischen bzw. Urin

Harnsäureniederschläge auf der Säule müssen vermieden werden. Daher werden, um einen Teil der Harnsäure auszufällen, harnsäurehaltige Flüssigkeiten vor dem Auftragen durch Zugabe von 5 n HCl auf pH 1 - 2 eingestellt, kurz aufgeköcht und zumindest 12 Stunden in den Kühlschrank gestellt.

Direkt vor dem Auftragen wird die Flüssigkeit 5 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert.

Sie wird in 2 - 3 ml Mengen auf die Säule aufgetragen; bei Urin der 300ste Teil des 24 - Stundenurins, also 5 ml bei 1500 ml/d.

Mit 2 x 3 - 4 ml des ersten Elutionsmittels wird die aufgetragene Flüssigkeit eingespült.

e) Elutionsvorgang

Das gewünschte Elutionsmittel wird quantitativ in den Schütteltrichter eingemessen. Nach verdünnter HCl kann 4 n HCl oder Ammoniaklösung direkt anschließend eingefüllt werden.

Durch Zusammendrücken der Schlauchverbindung wird das Elutionsmittel 1 - 2 cm hoch auf die Säule gepumpt und läuft dann kontinuierlich weiter.

Das Fließtempo beträgt unter den beschriebenen Bedingungen 0,6 - 0,9 ml in der Minute.

f) Einengen von NH_3 - Eluat

Um 80 ml 2 % NH_3 - Eluat zu neutralisieren und auf 30 ml einzuengen (s. II, 6), haben wir es mit Siedesteinchen 30 - 40 Minuten gekocht.

g) Enzymatische Bestimmung des Eluates

Nach dem Einengen wird das Eluat in einen geschliffenen 50 ml Meßzylinder übertragen, mit 5 ml 0,6 n Glycin pH 9,0 gepuffert und auf 48,5 ml aufgefüllt; 3 % werden später als Enzyme zugefügt.

Xanthinoxydase und Uricase wirken beide bei pH 9,0 ein; dadurch entfällt die pH - Umstellung, und die Enzyme können gleichzeitig wirken.

Von dem gepufferten und aufgefüllten Eluat werden 2 x 3 Ansätze (A,B,C) in Reagenzgläser eingemessen.

A.

3 ml Eluat (Puffer)

90 μ l H₂O

B.

3 ml Eluat (Puffer)

70 μ l Xanthinoxydase

20 μ l H₂O

C.

3 ml Eluat (Puffer)

70 μ l Xanthinoxydase

20 μ l Uricase

A - C gleichzeitig ansetzen, die Gläser abgedeckt gut schütteln und 2 Stunden warten.

Die Enzymleerwerte (A_E , B_E , C_E) werden entsprechend angesetzt; statt Eluat 0,06 n Glycinpuffer verwenden.

Der Reagenzglasinhalt wird direkt vor dem Umfüllen in Quarzküvetten geschüttelt. In Küvette für A nur A füllen, usw.

Es wird bei 292 und 280 mp abgelesen.

A = 0,000 setzen.

Küvetten vor und nach der Messung mit aqua dest. gefüllt gegen den leeren Strahlengang bei 292 und 280 mp eichen; eventuelle Unterschiede bei der Berechnung berücksichtigen.

h) Berechnung

Liegen bei der Doppelbestimmung, die stets ausgeführt wird, Differenzen $> 3 - 4 \%$ vor, so wird sie wiederholt, sonst wird nur der zweite Wert verwendet; die erste Probe dient zur Spülung der Küvetten. Es gilt:

$$[B - B_E] - [C - C_E] = -\Delta E_{HS} \quad \text{durch Harnsäure}$$

aus Xanthin und Hypoxanthin.

Daraus ergibt sich nach Praetorius und Poulsen (38):

$$\frac{-\Delta E_{292} \cdot n}{0,0745} = \mu \text{ g/ml (Harnsäure in 1 ml Urin)}$$

n = Nenner der Urinverdünnung; bei uns 1 : 10 (außer Tab. 5, Vers. 3 - 7), bezogen auf 1500 ml/d, also n = 10.

Die Umrechnung auf 1500 ml/d ergibt sich aus folgender Überlegung:

Zur Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin wird der 300ste Teil eines 24 - Stundenurins eluiert und stets auf $48,5 + 1,5 = 50 \text{ ml}$ verdünnt. Das entspricht bei dem 300sten Teil von 1500 ml = 5 ml genau einer Verdünnung von 1 : 10. Daher wird die Xanthin- und Hypoxanthinberechnung immer auf 1500 ml/d bezogen.

Aus der Berechnung oben folgt daher:

$\mu\text{g/ml} \cdot 1,500 = \text{mg Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin in 24 Stunden.}$

Dazu ein Beispiel: Ein 24 - Stundenurin mit 1680 ml wird untersucht. $1680 : 300 = 5,7$ ml, werden auf die Säule aufgetragen und eluiert. Das auf 50 ml aufgefüllte Eluat wird untersucht und zeigt z. B.

$-\Delta_E 292 = 0,090$ für Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin. Daraus ergibt sich:

$$\frac{0,090 \times 10 \times 1,500}{0,0745} = 0,090 \times 201 = 18,1 \text{ mg Harnsäure}$$

aus Xanthin und Hypoxanthin in 24 Stunden.

i) Harnsäurebestimmung im Urin

Die ursprüngliche Harnsäure im Urin wird durch Uricase mit der Methode von Praetorius und Poulsen (38), in der Modifikation von Zöllner (31) bestimmt.

3. Prüfung der Methode

a) Auswaschen der Harnsäure

Harnsäure läßt sich aus Dowex 50 H^+ mit verdünnter Salzsäure eluieren (18,29,30). Es wurde 0,05 n und 0,01 n HCl untersucht. Beide eluieren Harnsäure gleich gut; doch wäscht 0,05 n HCl schon nach ca. 100 ml Xanthin aus, 0,01 n HCl erst nach ca. 170 ml (s. Abb. 4 und 5).

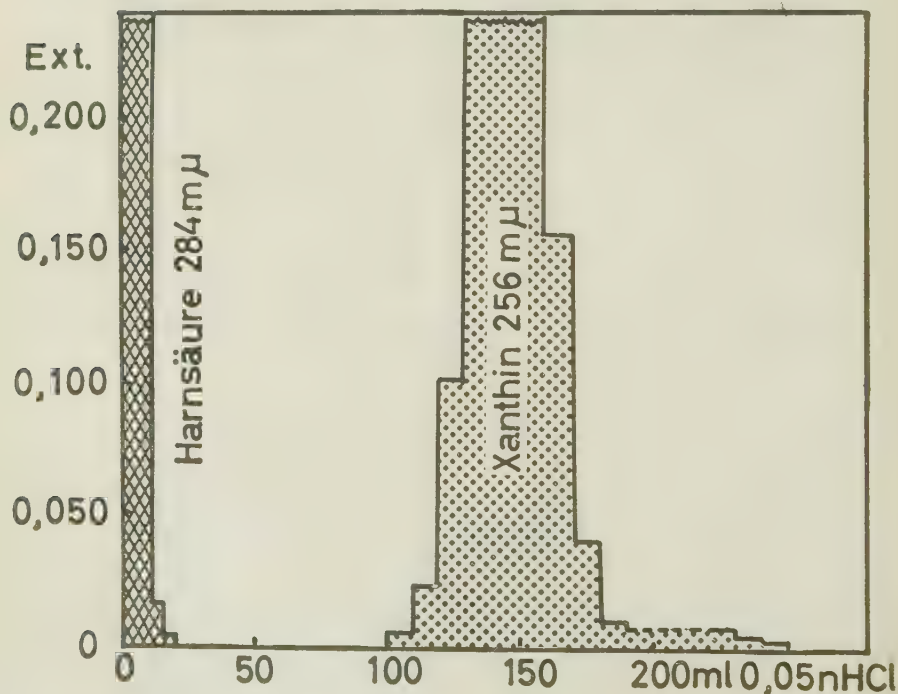


Abbildung 4: Elution von Harnsäure und Xanthin aus Dowex 50 H^+ , 10 x 0,8 cm mit 250 ml 0,05 n HCl. Aufgetragene Mengen: 3,75 mg Harnsäure; 0,27 mg Hypoxanthin; 0,30 mg Xanthin. Fließtempo: 0,8 ml/Min.

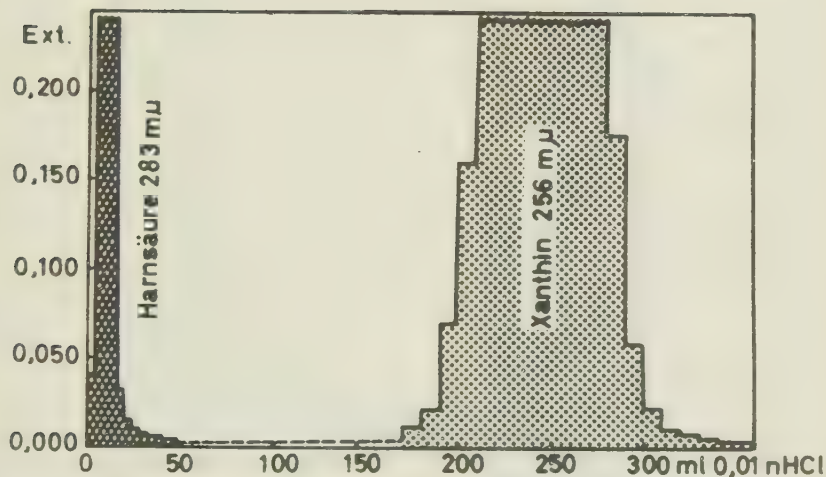


Abbildung 5: Elution von Harnsäure und Xanthin aus Dowex 50 H^+ mit 360 ml 0,01 n HCl. Aufgetragene Mengen: 3,75 mg Harnsäure; 0,27 mg Hypoxanthin; 1,1 mg Xanthin. Fließtempo: 0,8 ml/Min.

Nach unseren Erfahrungen genügen 70 ml 0,01 n HCl, um Harnsäure völlig zu entfernen; Xanthin und Hypoxanthin bleiben quantitativ auf der Säule.

b) Elution von Xanthin und Hypoxanthin

Nach dem Abtrennen von Harnsäure kann man Xanthin und Hypoxanthin mit starker Salzsäure (5,18,32 - 34) oder Ammoniaklösung aus der Dowex 50 H^+ Säule eluieren.

Wir fanden mit 4 n HCl rasche und völlige Elution von Xanthin und Hypoxanthin (s. Abb. 6).

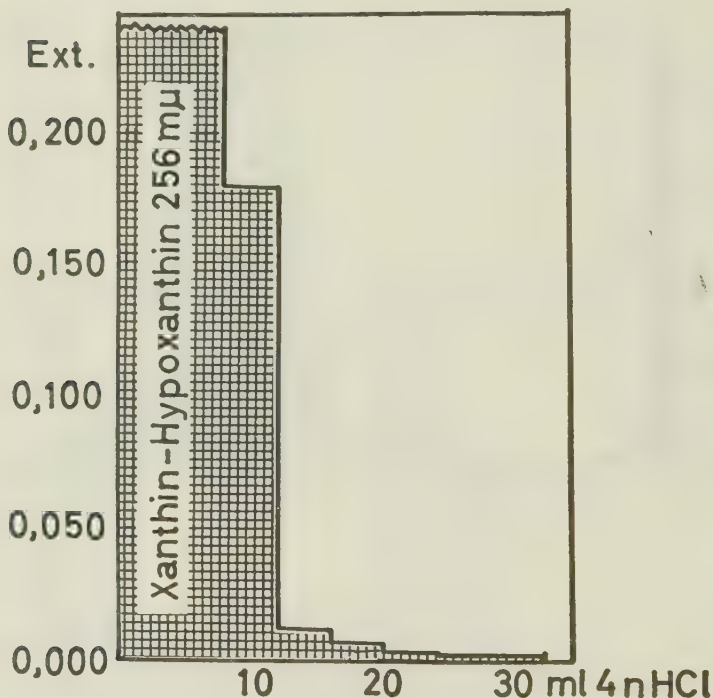


Abbildung 6: Elution von Xanthin und Hypoxanthin aus Dowex 50 H^+ , 10 x 0,8 cm mit 4 n HCl. Aufgetragene Mengen: 75 μg Xanthin; 67 μg Hypoxanthin. Fließtempo: 0,7 ml/Min.

Diese Methode läßt sich nicht zur enzymatischen Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin verwenden, da wir fanden, daß Xanthinoxidase in 4 n NaCl bei pH 8,2 nicht mehr quantitativ arbeitet.

Neben HCl wird in der Literatur 1,7 - 10 % NH_3 (18,29,30) zur Elution von Xanthin und Hypoxanthin vorgeschlagen. Wir fanden mit 5 % NH_3 befriedigende Elution (s. Abb. 7).

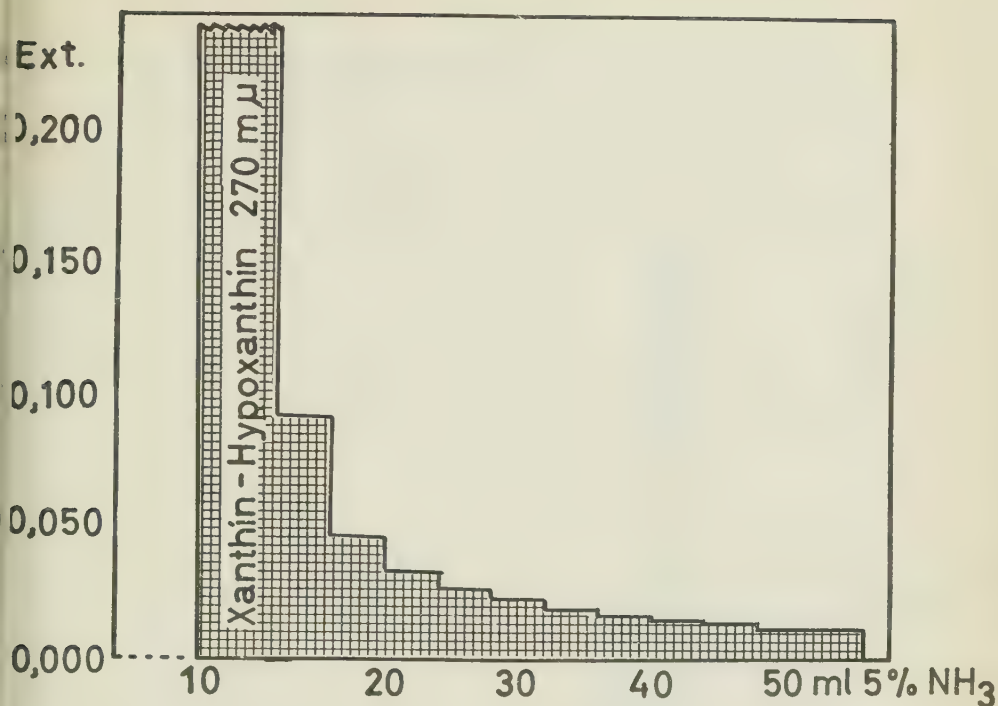


Abbildung 7: Elution von Xanthin und Hypoxanthin mit 5 % NH₃ aus Dowex 50 H⁺, 10 x 0,8 cm. Aufgetragene Mengen: 75 μg Xanthin; 67 μg Hypoxanthin. Ab 36 ml ist das Eluat oxypurinfrei; NH₃ - Eluat aus Dowex 50 zeigt stets Eigenextinktion von 0,010 bis 0,020.

Es wurde untersucht, ob 5 % NH₃ Xanthin und Hypoxanthin angreift. Dazu wurden 20 μmol/l Xanthin bzw. Hypoxanthin 3 mal mit je 50 ml 5 % NH₃ auf 20 ml eingengt. Danach wurden nur 97 % der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden.

Bei gleichem Vorgehen mit 2 % NH₃ konnten mehr als 99 % nachgewiesen werden.

2 % NH_3 eluiert Xanthin und Hypoxanthin fast genauso schnell und quantitativ wie 5 % NH_3 (s. Abb. 8). Daher entschieden wir uns für 2 % NH_3 .

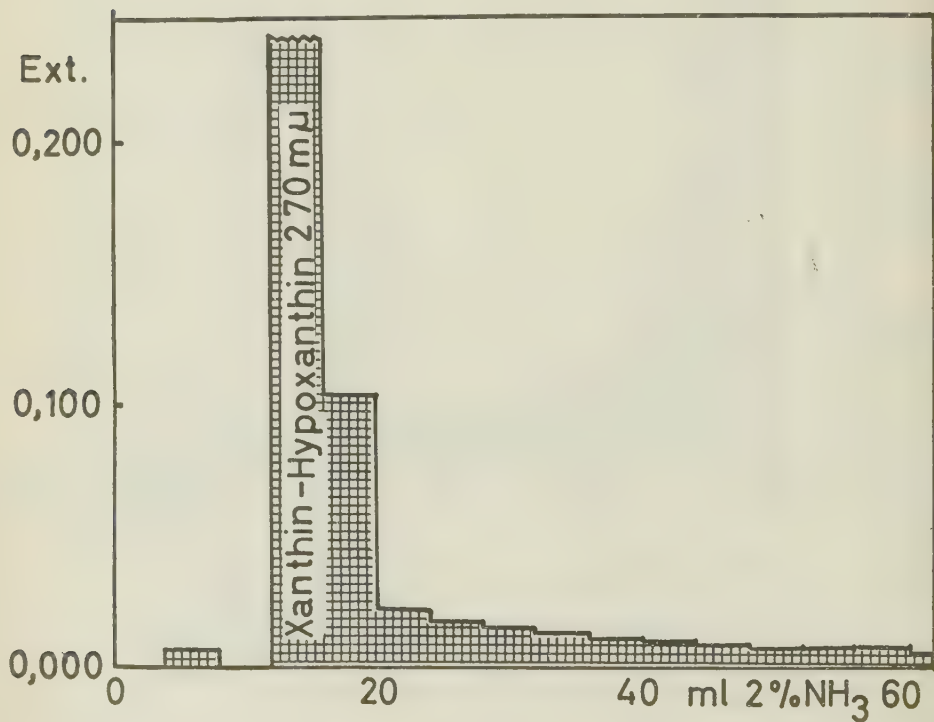


Abbildung 8: Elution von Xanthin und Hypoxanthin mit 2 % NH_3 . Aufgetragene Mengen: 75 μg Xanthin; 67 μg Hypoxanthin. Fließtempo: 0,6 ml/Min.

80 ml 2 % NH_3 genügen reichlich, um Xanthin und Hypoxanthin 100 %ig aus einer 10 x 0,8 cm Dowex 50 H^+ freizusetzen.

c) Eluat- und Enzymkonzentrationen

Bei der Entwicklung der Methode wurde auch Urin-eluat, 1 : 5 verdünnt, bezogen auf 1500 ml Tagesurin, mit 50 μ l Xanthinoxydase und 10 μ l Uricase pro 3 ml = 2 % Enzyme, untersucht. Versuch 3 - 7, Tab. 5 zeigen bei dieser Anordnung befriedigende Resultate.

Zeitliche Beobachtung von Tab. 5, Versuch 3 zeigte, daß 90 Minuten nach Xanthinoxydase das Eluat völlig ruhig war; die nachfolgende Reaktion mit 10 μ l Uricase war nach 40 Minuten völlig beendet.

2 % Enzyme (s. o.) sind also bei 1 : 5 verdünntem Eluat ausreichend.

Später gingen wir zu Eluatverdünnung 1 : 10 bei 2 % Enzymen über (s. Tab. 5, Versuch 8 - 21). Bei Tab. 5, Versuch 22, reichte die Uricasekonzentration nicht aus, daher verwenden wir seitdem 20 μ l Uricase und 70 μ l Xanthinoxydase pro 3 ml 1 : 10 verdünntem Urineluat = 3 % Enzyme.

Ab Tab. 5, Versuch 22, sind also die Enzymkonzentrationen 3 - 4 mal so hoch wie in Tab. 5, Versuch 3 - 7, bezogen auf die Urinverdünnung im Eluat.

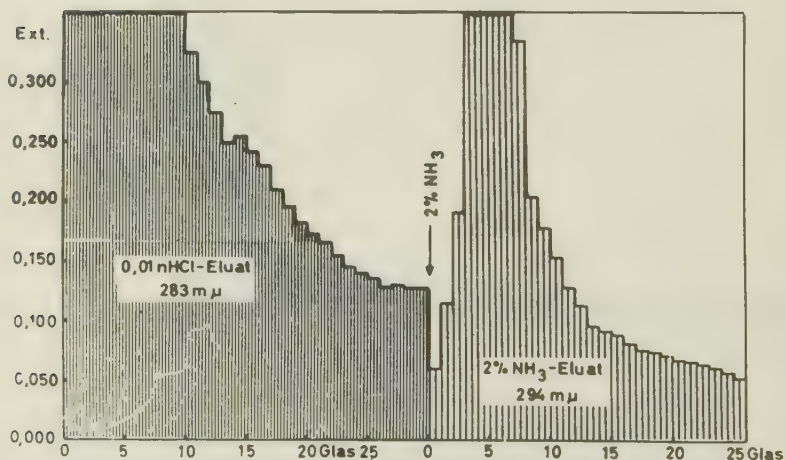
1 : 10 verdünntes Urineluat gibt $-\Delta_E$ 292 durch Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin zwischen 0,050 und 0,150. Die Grundextinktion läßt einheitliche Lichtspaltbreite von 0,2 mm zu.

d) Absetzen lassen, Zentrifugieren

Wenn man Uricase 20 μ l/3 ml 5 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert, dann vermindert sich ihre Eigenextinktion um 50 %.

Zentrifugiert man auch die mit Enzym versetzten Eluate, so findet man stark verzerrte Quotienten $\Delta E \frac{292}{280}$. So fanden wir bei Tab. 5, Versuch 25, 27 - 30 nach Zentrifugieren Quotienten von - 3,8 bis 3,32.

Unter Umständen kann allein schon das zweistündige Stehen nach Enzymzugabe zu Störungen führen. Wir fanden beim Messen ohne vorheriges Schütteln der Reagenzgläser für Tab. 6, Versuch U. H. 8^h, 1,19 und Versuch J. R. 8^h, 1,85; bei Wiederholung der Bestimmungen mit vorherigem Schütteln, waren die Quotienten normal.



Abbildungung 9: Zeitlicher Verlauf der Elution von Urin aus Dowex 50 mit 0,01 n HCl und 2 % NH₃ unter Bedingungen wie bei der neu entwickelten Methode zur Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin im Urin. Aufgetragene Menge Urin: 5 ml von 1500 ml/d. 4 ml pro Glas Eluat.

e) Spektrum von 2 % NH_3 - Eluat

Das Spektrum unseres 2 % NH_3 - Urineluates zeigt bei 292 m μ $3 \frac{1}{2}$ mal niedrigere Extinktion als eine vergleichbare harnsäurefreie Urinverdünnung (s. Abb. 3).

Die Höhe der Eluatextinktion ist abhängig von der 0,01 n HCl und 2 % NH_3 - Durchflußmenge. Je mehr 0,01 n HCl und je weniger 2 % NH_3 durchfließt, desto geringer die Eluatextinktion. Das wird ersichtlich aus Abb. 9.

2 % NH_3 eluiert fast alles, was 0,01 n HCl in der Säule beläßt.

f) Kontrolle der Methode

- aa) Bei der fraktionierten Urinelution von Abb. 9 entnahmen wir Stichproben und untersuchten sie mit Xanthinoxydase und Uricase bei pH 9,0.

Dabei fanden wir, daß das 0,01 n HCl - Eluat ab Glas 13 (52 ml) harnsäurefrei war. Bei Glas 29 (116 ml) ergab es mit Xanthinoxydase keine Extinktionsänderung.

Das 2 % NH_3 - Eluat gab bei Glas 15 (60 ml) noch Δ_E 292 + 0,001, wahrscheinlich durch Adenin.

- bb) Das Urineluat kann einfach auf ursprüngliche Harnsäure untersucht werden. Dazu versetzt man es mit 10 μ l Uricase/3 ml und liest nach 1 Min. und 20 Min. bei 292 m μ ab.

Untersuchung von über 25 Eluaten ergab dabei einen Mittelwert von $-\Delta_E$ 292 0,003 (0,001 bis 0,009). Berücksichtigt man das Absetzen von Verunreinigungen und die Schwierigkeiten beim Ablesen (Grundextinktion um 0,500), so kann man sagen, daß die Urineluate nach 70 ml 0,01 n HCl durchweg harnsäurefrei sind.

cc) Bei Unzulänglichkeit der Enzymkonzentrationen fanden wir hohe Abweichungen der Vergleichsuntersuchungen, >5 - 10 % z. B. bei Urin von Tab. 5, Versuch 22. Daher sollte jedes Eluat zumindest zweifach bestimmt werden. 3 % Enzym in Eluat 1 : 10 (s. o.) reichten bei unseren Untersuchungen stets aus.

dd) Störungen durch die Grundextinktion lassen sich durch den Quotienten $\Delta E \frac{292}{280}$ kontrollieren. In reinen Harnsäurelösungen liegt er um 1,48; (s. Abb. 2 und Tab. 5, Versuch 1 u. 2).

Normalerweise werden Versuche mit Quotienten unter 1,42 und über 1,53 wiederholt.

ee) pH - Kontrolle:

Das eingeengte NH_3 - Eluat ist schwach alkalisch (pH 7,0 - 7,5; Kationen aus Kationenaustauscher!); es läßt sich mit 0,06 n Glycinpuffer sicher auf pH 9,0 einstellen. Bei zahlreichen Kontrollen fanden wir nie Abweichungen von pH 9,0.

4. Zusammenfassende Darstellung der Methode

Etwa 50 ml eines abgemessenen 24 - Stundenurins mit 5 n HCl auf pH 1 - 2 einstellen.

Kurz aufkochen und abgedeckt zumindest 12 Stunden im Kühlschrank stehen lassen.

Direkt vor dem Auftragen zentrifugieren.

$\frac{1}{300}$ stel der 24 Stundenmenge in Portionen von ca. 2,5 ml auf eine 10 x 0,8 cm Dowex 50 H^+ - Säule auftragen. Mit 2 x 3 ml 0,01 n HCl nachspülen.

Über einen Schütteltrichter insgesamt 70 ml 0,01 n HCl durch die Säule laufen lassen. Der Flüssigkeitsspiegel auf der Säule soll 2 cm nicht

überschreiten.

Das 0,01 n HCl - Eluat verwerfen.

Anschließend mit genau 80 ml 2 % NH_3 Xanthin und Hypoxanthin eluieren.

Das NH_3 - Eluat durch Kochen mit Siedesteinchen auf 20 - 30 ml einengen.

Das eingeeengte Eluat vorsichtig in geschliffenen 50 ml - Meßzylinder übertragen. 5 ml 0,6 n Glycinpuffer pH 9,0 zugeben. Mit aqua dest. bis 48,5 ml auffüllen, dabei die Siedesteinchen nachspülen.

Das gepufferte Eluat wird enzymatisch doppelt bestimmt wie II, 2 g angegeben.

Berechnung: $-\Delta_E 292$ durch Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin + Uricaseeigenextinktion $\times 201 = \text{mg}$ Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin pro 24 Stunden.

Zur ständigen Kontrolle der Grundextinktion wird der Quotient $\Delta_E \frac{292}{280}$ der aus Xanthin und Hypoxanthin entstandenen Harnsäure berechnet; er liegt normalerweise zwischen 1,42 und 1,53.

Zur Kontrolle der Harnsäureelution können 3 ml Eluat mit 10 μl Uricase untersucht werden. Es wird nach 1 Min. und nach 20 Min. bei 292 $\text{m}\mu$ abgelesen; $-\Delta_E 292 (0,003 \pm 0,001)$ ist normal.

Eine Urinuntersuchung auf Xanthin und Hypoxanthin dauert 8 - 9 Stunden.

V ERGEBNISSE

a) Quantitative Werte aus reiner Lösung und Urin.

Tab. 5, Vers. 1 u. 2 wurde mit reiner Xanthin- bzw. Hypoxanthinlösung in 0,06 n Glycin, pH 9,0 ausgeführt. Sie wurden enzymatisch genau wie Urin- eluat bestimmt.

Urin zugesetztes Xanthin bzw. Hypoxanthin wird zu 96 % - 100 % wiedergefunden. Bei Tab. 5, Vers. 4,5 10,11,13,14 wurden 2 - 20 $\mu\text{mol/l}$ vor dem Auftragen auf die Säule zugesetzt. Versuch 18 - 21 und 24 - 26 wurden zu Beginn der Urinvorbereitung, s. IV,2,d, mit Xanthin bzw. Hypoxanthin versetzt.

b) Normalwerte für 24 - Stunden - Urine.

Die 24 - Stunden - Urine von Tab. 5, Versuch 17 - 43, stammen von 10 männlichen Normalpersonen zwischen 22 und 25 Jahren. Insgesamt wurden 13 24 - Stunden - Urine untersucht. Davon wurden 6 Urine von 3 gleichen Versuchspersonen an verschiedenen Tagen geliefert s. Tab. 5, Vers. 17,43,31,32; und 40,41.

Der Mittelwert von 13 Normalurinen ergibt 18,2 (9,3 - 23,7) mg Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin pro 24 Stunden.

Das Verhältnis Harnsäure : Xanthin und Hypoxanthin schwankt von 17,4 : 1 bis 57,7 : 1. s. Tab. 5, HS : X + HY.

Die Substanzen stehen also nicht in fester Beziehung zueinander.

Die Xanthin und Hypoxanthinausscheidung bei ein und derselben Person scheint von Tag zu Tag zu

schwanken; vgl. Tab. 5, Vers. 17 u. 43; 31 u. 32; 40 u. 41.

c) Stündliche Ausscheidung von Xanthin und Hypoxanthin.

Zwei männliche Versuchspersonen wurden 2 Tage lang mit purinarmer Diät ernährt; dazu dienten täglich 700 g Vollkostpulver "Sonana" auf Trockenmilchbasis und Wasser. Am dritten Tag blieben die Versuchspersonen nüchtern bis 14 Uhr. Danach wurde eine einfache Mehlspeise eingenommen.

Die Blase wurde um 7^h entleert; der Nachturin verworfen. Von 8^h - 18^h wurde durch möglichst vollkommene spontane Blasenentleerung der Urin in 2 Stunden - Abständen gesammelt. Jeweils nach der Miktion tranken die Versuchspersonen 250 ml Wasser.

In den Urinportionen wurde Xanthin und Hypoxanthin und Harnsäure nach IV,4 bzw. IV,2,i bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 6 wiedergegeben. Die stündliche Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung schwankt bis über 100 %; sie scheint morgens und abends niedriger zu sein als mittags. Einzelne Stundenausscheidungen (Tab. 6, U. H. 10^h, J. R. 12^h) erreichen das 2 - 3 fache der Tagesnorm.

Das Verhältnis Harnsäure : Xanthin und Hypoxanthin schwankt stark von 8,9 - 33,1. Es ist insgesamt gegenüber den 24 - Stunden - Werten erniedrigt.

A - C ist positiv. Es werden also nur wenig oder keine Stoffe außer Xanthin und Hypoxanthin von Xanthinoxidase oxydiert. Das ist wahrscheinlich durch die strenge Diät bedingt.

d) Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung nach
Ribonukleinsäure - Gabe.

Es wurde die stündliche Xanthin- und Hypoxanthin-ausscheidung nach RNS - Gabe untersucht. Dazu diente die gleiche Versuchsanordnung wie IV,5,c. Jedoch wurde der Urin bis 14^h stündlich gesammelt. Um 10^h nahmen die beiden Versuchspersonen 4 g Ribonukleinsäure aus Hefe mit 10 g Cellulosepulver oral ein.

Tab. 7 gibt die Ergebnisse wieder. Die stündlichen Ausscheidungen schwanken stark und lassen nur unsichere Aussagen zu.

Die Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung liegt in Tab. 7 insgesamt etwa um 20 % höher als in Tab. 6; das betrifft aber auch die Werte vor RNS - Gabe von 8^h - 10^h.

Die Harnsäureausscheidung ist nach RNS - Gabe eindeutig erhöht; von 11^h bis 18^h liegt sie im Mittel 30 % höher als bei entsprechenden Werten in Tab. 6.

VI DISKUSSION DER NEUEN METHODE

Es wird eine Methode beschrieben, Xanthin und Hypoxanthin des Urins in harnsäurefreiem Kationenaustauschereluat zu bestimmen. Dazu wirken Xanthinoxydase und Uricase bei gleichem pH gleichzeitig auf das Eluat ein. Die Zulässigkeit dieses Vorgehens erweist der Vergleich von Tab. 5, V. 1 u. 2 mit der Bestimmung nach Kalckar (s. III,1).

Es gelang, die Elutionsmittel so zu wählen, daß die Grundextinktion des Urineluates 3,5 mal kleiner ist als verdünnter Urin gleicher Konzentration (s. Abb. 3). Das Eluat ist dabei optisch ruhig (s. IV,3,c). Die Enzymkonzentrationen sind etwa 4 mal so hoch gewählt wie in normalem Urineluat erforderlich, um auch unerwartet hohen Hemmungen zu begegnen.

Durch Doppelbestimmung, den Quotienten $\Delta_E \frac{292}{280}$ und die Untersuchung auf ursprüngliche Harnsäure kann die Zuverlässigkeit jeder Bestimmung kontrolliert werden (s. IV,3,f).

Die Methode arbeitet bei 2 - 20 μmol Xanthin bzw. Hypoxanthin/l mit 0 - 4 % Verlust, also quantitativ (s. IV,5,a). Völlig getrennte Parallelversuche weichen bei uns nie mehr als $\pm \Delta_E 292 \text{ } 0,002$ oder $\pm 2 \%$ vom Mittelwert ab (s. Tab. 5).

Xanthin und Hypoxanthin kann man in reinen Gemischen getrennt bestimmen (35). Dazu werden die Extinktionsänderungen durch Xanthinoxydase bei verschiedenen Wellenlängen gemessen; z. B. bei 273 und 292 $\mu\mu$, vgl. Abb. 1. Jørgensen beschreibt dies auch für inkubiertes Blut (36).

Im Urin ist die getrennte Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin mit dieser Methode nicht möglich, da Xanthinoxydase neben Xanthin und Hypoxanthin viele weitere Substanzen oxydiert. $A - [C - C_E]$ ist in unseren 24 - Stunden - Urinen stets negativ (s. Tab. 5).

In reinen Xanthin- und Hypoxanthingemischen müßte es positiv sein.

Unsere Methode könnte man zu einer getrennten Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin weiterentwickeln. Man könnte wahrscheinlich Xanthin mit verdünnter Salzsäure von Hypoxanthin trennen, vgl. Abb. 4 u. 5. Im Rahmen unserer Arbeit hatten wir leider nicht Gelegenheit, dieser interessanten Aufgabe nachzugehen.

Weissmann (19) gibt halb - quantitative Einzelwerte für Xanthin und Hypoxanthin an. Er findet 6,1 mg Xanthin und 9,7 mg Hypoxanthin im 24 - Stunden - Urin. Sein Wert für Xanthin und Hypoxanthin zusammen mit 15,8 mg liegt etwas unter unserem von 18,2 mg Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin pro Tag.

Jørgensen u. Poulsen (21) finden offenbar doppelt so hohe Xanthin- und Hypoxanthinwerte wie wir. Sie geben an, Xanthin und Hypoxanthin verhalte sich zur Harnsäure pro Tag wie 1 : 10 bis 1 : 20; wir finden Proportionen von 1 : 18 - 1 : 57.

Die stündliche Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung (s. Tab. 6) ist tagsüber höher als der 24 - Stunden - Durchschnitt. Daher ist zu erwarten, daß sie während der Nachtstunden unter dem Tagesdurchschnitt liegt. Ausschlaggebend könnte dabei die körperliche Aktivität (37) sein. Das würde zum Teil auch die großen Schwankungen im RNS - Versuch (s. Tab. 7) verständlich machen. Es ist uns im übrigen nicht möglich, das Verhalten von Xanthin und Hypoxanthin im RNS - Versuch überzeugend zu erklären. Der RNS - Versuch kann nur als erster Schritt zur Erforschung des Xanthin- und Hypoxanthinstoffwechsels gelten. Erst eine breite Anwendung der oben entwickelten Methode wird den Xanthin- und Hypoxanthinstoffwechsel für das Verständnis des ganzen Purinstoffwechsels nutzbar machen können.

nen (Vers. 3 - 43).

XO = Xanthinoxidase; X + HY = Xanthin und Hypoxanthin;

HS = Harnsäure; " ΔE_{292} durch XO ohne HS" = ΔE_{292} durch Xanthinoxidase

ohne die durch Harnsäure bedingte Extinktion, also $A - [C - C_F]$;

ΔE_{292} gibt den Quotienten an, der durch Oxydation der aus Xanthin und

Hypoxanthin entstandenen Harnsäure bedingt ist; $\frac{HS}{X + HY}$ = Quotient aus

Harnsäure pro Tag dividiert durch Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin

pro Tag.

2 % Enzym heißt 50 μ l XO und 10 μ l Uricase pro 3 ml untersuchtes Eluat.

3 % Enzym heißt 70 μ l XO und 20 μ l Uricase. Die Verdünnung 1 : 5 und 1 : 10

ist auf 1500 ml Tagesharn umgerechnet. Die Versuche 8 - 43 wurden in

0,06 n Glycinpuffer durchgeführt.

	ΔE_{292} durch XO ohne HS	$-\Delta E_{292}$ nach XO durch Uricase	ΔE_{292} aus X + HY	mg HS pro Tag	HS X + HY
1) 20 μ mol Xanthin/l in 0,06 n Glycin	0,072	0,251	1,47	(25,1)	-
2) " Hypoxanthin/l " "	0,001	0,250	1,49	(25,0)	-
3) W.S.; Eluat 1:5; 0,12 n Glycin;	-0,170	0,102	1,46	10,2	-
2 % Enzyme					
4) W.S. mit 20 μ mol/l Xa; 3 abgezogen	+0,059	0,234	1,55	(23,4)	
2 % Enzyme					
5) W.S. mit 20 μ mol/l HY; 3 abgezogen	-0,004	0,251	1,48	(25,1)	
2 % Enzyme					
6) A.B.; Eluat 1:5; 0,12 n Glycin;	-0,012	0,329	1,50	32,9	
2 % Enzyme					
7) A.B.; Eluat 1:5; 0,12 n Glycin;	-0,013	0,326	1,50	32,6	
2 % Enzyme					
8) A.B.; Eluat 1:10; 0,06 n Glycin;	-0,007	0,168	1,46	33,8	
2 % Enzyme					
9) A.B.; Eluat 1:10; 0,06 n Glycin;	-0,007	0,164	1,45	33,0	
2 % Enzyme					
10) A.B.; Eluat 1:10; 0,06 n Glycin;	-0,009	0,165	1,46	33,2	
2 % Enzyme					
11) A.B. wie 8) + 2,5 μ mol X/l	+0,010	0,030	1,36	(6,0)	

13) A.B. wie 8) + 10 µmol X/l 8) abgezogen	+0,035	0,119	1,50	(23,9)	
14) A.B. wie 8) + 10 µmol HY/l 8) abgezogen	+0,003	0,124	1,49	(24,9)	
15) G.D. 1:10; 2 % Enzyme	-0,129	0,048	1,46	9,65	294
16) " " "	-0,129	0,047	1,47	9,45	
17) U.H. 16. 6.; 1:10; 2 % Enzyme	-0,035	0,112	1,42	22,5	392
18) " " "	-0,035	0,109	1,43	21,9	
19) U.H. + 2,5 µmol X/l Mittelwert 17,18 abgezogen	+0,008	0,023	1,64	-	
20) U.H. + 2,5 µmol X/l Mittelwert 17,18 abgezogen	+0,005	0,022	1,47	-	
21) U.H. + 2 µmol HY/l Mittelwert 17,18 abgezogen	-0,001	0,026	1,45	-	
22) E.M.; 1:10; 3 % Enzyme	-0,031	0,086	1,53	17,3	588
23) " " "	-0,028	0,085	1,52	17,1	
24) E.M. + 20 µmol X/l 22) abgezogen	+0,078	0,241	1,48	-	
25) " " " HY/l "	+0,080	0,251	1,46	-	
26) " " " HY/l "	+0,001	0,240	1,48	-	
27) H.A.; 1:10 Eluat; 3 % Enzyme	-0,088	0,112	1,51	22,5	21,2
28) " " " "	-0,084	0,109	1,49	20,0	
29) K.H.; " " "	-0,037	0,079	1,49	15,9	583
30) " " " "	-0,043	0,080	1,48	16,1	
31) G.A. 24. 6.; 1:10 Eluat; 3 % Enzyme	-0,002	0,100	1,47	20,1	613
32) G.A. 29. 6.; " " "	-0,010	0,099	1,46	19,9	830
33) " " " "	-0,011	0,097	1,45	19,5	
34) M.St. " " "	-0,056	0,054	1,39	10,9	569
35) " " " "	-0,059	0,053	1,47	10,7	
36) E.Z. " " "	-0,058	0,118	1,42	23,7	802
37) F.M. " " "	-0,016	0,046	1,44	9,2	516
38) " " " "	-0,015	0,047	1,43	9,4	
39) " " " "	-0,015	0,049	1,40	9,8	379
40) J.R. 25. 7.; " " "	-0,003	0,084	1,42	16,9	830
41) J.R. 13. 8.; " " "	-0,008	0,114	1,42	22,9	57,7
42) U.H. 13. 8.; vgl. V. 17) " " "	-0,042	0,063	1,50	12,7	733
43) M. Sch. " " "	-0,042	0,113	1,41	22,7	713
					34,0
					588
					21,2
					36,6
					30,5
					41,7
					52,0
					33,8
					55,8
					22,4
					36,3
					57,7
					31,4

Tabelle 6: Stundenausscheidung von Oxypurinen im gesunden Urin.

		Δ_E^{292} durch XO ohne HS	$-\Delta_E^{292}$ nach XO durch Uricase	Δ_E^{292} 280	mg HS aus X + HY pro Std.	mg HS pro Std.	$\frac{HS}{X + HY}$
Versuch 1:							
U. H.	8 h	+0,003	0,135	1,53	1,13	19,2	17,0
30. 7.	10 h	+0,017	0,268	1,51	2,24	20,0	8,9
	12 h	+0,026	0,242	1,43	2,03	20,6	10,1
	14 h	+0,017	0,193	1,52	1,62	11,4	7,0
	16 h	+0,012	0,152	1,46	1,27	20,2	15,9
	18 h	+0,010	0,107	1,43	0,90	17,5	19,4
Versuch 2:							
J. R.	8 h	+0,005	0,082	1,49	0,68	14,7	21,6
30. 7.	10 h	+0,010	0,179	1,47	1,50	27,3	18,2
	12 h	+0,023	0,235	1,51	1,95	29,4	15,1
	14 h	+0,004	0,045	1,50	0,30	6,0	15,8
	16 h	+0,023	0,332	1,47	2,70	43,2	16,0
	18 h	+0,012	0,104	1,48	0,87	28,8	33,1

Zeichenerklärung s. Tab. 5

Tabelle 7: Oxypurinausscheidung nach 4 g Ribonukleinsäure im gesunden Stundenurin.

		$\Delta_E 292$ durch XO ohne HS	$-\Delta_L 292$ nach XO durch Uricase	$\Delta_E \frac{292}{280}$	mg HS aus X + HY pro Std.	mg HS pro Std.	HS X + HY
Versuch 1:							
J. R.	8 h	0,018	0,187	1,45	1,57	17,4	11,1
26. 7.	9 h	0,024	0,245	1,47	2,06	20,2	9,8
	10 h	0,024	0,342	1,46	2,87	21,6	7,5
4 g RNS -->							
	11 h	0,018	0,343	1,47	2,92	11,1	3,8
	12 h	0,019	0,247	1,51	2,07	26,2	12,7
	13 h	0,027	0,235	1,45	1,97	36,1	18,3
	14 h	0,022	0,229	1,50	1,92	26,0	13,5
	16 h	0,027	0,244	1,45	2,05	25,8	12,6
	18 h	0,011	0,151	1,44	1,27	44,2	34,6
Versuch 2:							
J. R.	8 h	0,020	0,181	1,47	1,52	16,7	11,0
26. 7.	9 h	0,019	0,136	1,43	1,14	15,1	13,2
	10 h	0,022	0,243	1,43	2,04	20,9	10,2
4 g RNS -->							
	11 h	0,034	0,312	1,47	2,62	63,7	24,3
	12 h	0,032	0,206	1,49	1,73	28,1	16,2
	13 h	0,032	0,245	1,47	2,06	38,1	18,5
	14 h	0,005	0,052	1,49	0,44	8,1	18,4
	16 h	0,033	0,291	1,47	2,44	33,3	13,6
	18 h	0,019	0,157	1,46	1,32	48,0	36,4

Zeichenerklärung s. Tab. 5

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Methode von Jørgensen u. Poulsen zur Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin im Urin wird überprüft und verbessert. Parallelversuche ergeben Unterschiede bis zu 20 % und zeigen Störungen durch die Grundextinktion. Die Grundextinktion ist bei Jørgensens und Poulsens Bestimmungsmethode sehr hoch und optisch nicht ruhig. Die Methode erscheint zu einer quantitativen Bestimmung von Xanthin und Hypoxanthin nicht geeignet.

Es wird die Entwicklung einer neuen Methode beschrieben: Der 300ste Teil eines Tagesharns wird an einer stark sauren Kationenaustauschersäule mit 0,01 n HCl von Harnsäure befreit und mit 2 % NH_3 eluiert. Das Eluat zeigt 3,5 mal geringere, ruhige Grundextinktion als vergleichbarer Urin. Es wird mit Xanthinoxidase und Uricase bei ein und demselben pH ausgewertet.

Urin zugesetztes Xanthin bzw. Hypoxanthin wird zu 96 - 100 % wiedergefunden. Völlig getrennte Parallelversuche zeigen bis ± 2 % Abweichung vom Mittelwert.

Als normale 24 - Stunden Ausscheidung wird 18,2 mg Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin gefunden. Die Ausscheidung von Xanthin und Hypoxanthin scheint nicht in fester Beziehung zur Harnsäureausscheidung zu stehen.

Die stündliche Ausscheidung von Xanthin und Hypoxanthin wird über 11 Stunden hin verfolgt: Sie steigt morgens langsam über das doppelte des Tagesdurchschnitts an und geht am frühen Abend wieder zur Norm zurück.

Nach einer Gabe von 4 g Ribonukleinsäure scheint die Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung über 8 Stunden um 20 % erhöht. Im gleichen Zeitraum steigt die Harnsäureausscheidung um 30 % an.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Thannhauser, S.J. und G. Czonsicz: "Kennen wir Krankheiten des Menschen, die durch eine Störung des intermediären Purinstoffwechsels verursacht sind"? Dt. Arch. klin. Med. 135, 224 (1921)
- (2) Thannhauser, S.J.: "Über die Pathogenese der Gicht". Dt. med. Wochenschr. 81, 492 (1956)
- (3) Randerath, K.: "Dünnschichtchromatographie an Ionenaustauscherschichten". Angew. Chem. 73, 574 (1961)
- (4) Randerath, K.: "Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden". Angew. Chem. 74, 484 (1962)
- (5) Bishop, C., D. M. Rankine und J. H. Talbott: "The Nucleotides in Normal Human Blood". J. Biol. Chem. 234, 1233 (1959)
- (6) Bishop, C.: "Purine Metabolism Studied in Vivo by Injection of C¹⁴ Adenin". J. Biol. Chem. 236, 1778 (1961)
- (7) Bishop, C.: "Purine Metabolism in Human and Chicken Blood in Vitro". J. Biol. Chem. 235, 3228 (1960)
- (8) Jørgensen, S.: "Xanthine and Hypoxanthine in stored Human Blood". Acta Phar. Tox. 11, 265 (1955)
- (9) Bishop, C., D. M. Rankine und J. H. Talbott: "Purine Metabolism in Blood of Gouty Humans". Metabolism. 10, 724 (1961)
- (10) Bishop, C.: "Blood Nucleotides". J. Am. Med. Ass. 172, 817 (1960)
- (11) Jørgensen, S.: "Breakdown of Adenine and Hypoxanthine Nucleotides and Nucleosides in Human Plasma". Acta Phar. Tox. 12, 294 (1956)
- (12) Heppel, L.A. und J. C. Rabinowitz: "Enzymology of Nucleic Acids, Purines and Pyrimidines". Ann. Rev. Bioch. 27, 613 - 642 (1958)

- (13) Bergmeyer, H.: "Methoden der enzymatischen Analyse".
S. 702 - 712, Verlag Chemie, Weinheim, 1962
- (14) Meister, A.: "Adenosintriphosphatase Activity of Human Serum". Science (Washington) 109, 377 (1949)
- (15) Dixon, E. und M. Puridom: J. clin. Pathol.
7, 341 (1954)
- (16) Salomon, G. und M. Krüger: "Die Alloxurbasen des Harnes". Z. physiol. Chem. 24, 364 (1898)
- (17) Cole, W. H., W. H. Ellett und N. A. Womack: J. Lab. Clin. Med. 16, 918 (1931)
- (18) Weissmann, B., Ph. A. Bromberg und A. B. Gutman:
"The Purine Bases of Human Urine: I. Separation and Identification". J. Biol. Chem. 224, 407 (1957)
- (19) Weissmann, B., Ph. A. Bromberg und A. B. Gutman:
"The Purine Bases of Human Urine: II. Semiquantitative Estimation and Isotope Incorporation".
J. Biol. Chem. 224, 423 (1957)
- (20) Kalckar, H.: "Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by means of Specific Enzymes".
J. Biol. Chem. 167, 429 (1947)
- (21) Jørgensen, S. und H. E. Poulsen: "Enzymatic Determination of Hypoxanthine and Xanthine in Human Blood and Plasma". Acta Phar. Tox. 11, 223 (1955)
- (22) Massey, V. und C. Vegger: "Xanthin - Oxidase",
Ann. Rev. Bioch. 32, 601 - 604 (1963)
- (23) Renzo, H.: "Chemistry and Biochemistry of Xanthin-oxydase". Adv. in Enz. Vol. 117, 293 - 328 (1956)
- (24) Bergmann, F. und H. Kwietny: "Pteridines as Substrates of Mammalian Xanthin Oxidase".
Bioch. Biophys. Acta 33, 29 (1959)
- (25) Morell, D. B. "The Nature of Catalytic Activities of Milk Xanthine Oxidase".
Biochem. J. 51, 657 (1952)

- (26) Mahler, H.R.: "Uricase". The Enzymes, New York and London, Vol. 8, 285 (1963)
- (27) Keilin, D. und E. F. Hartree: Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B. 119, 114 (1936)
- (28) Brandenberger, H.: "Über den Abbau der Harnsäure zur Oxonsäure". Helv. chem. Acta 37, 641 (1954)
- (29) Dickstein, S., F. Bergmann und M. Chaimovitz: "Studies on Uric Acid and Related Compounds". J. Biol. Chem. 221, 239 (1955)
- (30) Bergmann, F., S. Dickstein und M. Chaimovitz: "Notes on the Quantitative Detection of Xanthines and Uric Acids in Plasma". J. Biol. Chem. 230, 193 (1958)
- (31) Zöllner, N.: "Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung". Z. klin. Chem. 1, 178 (1963)
- (32) Cohn, W.: "Separation of Purine and Pyrimidine Bases and of Nucleotides by Ion Exchange". Science (Washington) 109, 377 (1949)
- (33) Flavin, M. und M. Engelmann: "Aminopurine Interconversion in Tetrahymena Gelii". J. Biol. Chem. 200, 58 (1963)
- (34) Wall, J.S.: "Simultaneous Separation of Purines, Pyrimidines, Amino Acids and other Nitrogenous Compounds". Anal. Chem. 25, 950 (1953)
- (35) Plesner, P. und H. M. Kalckar: "Enzymatic Micro Determinations of Uric Acid, Hypoxanthine, Xanthine and Xanthopterin by Ultraviolet Spectrophotometry". Methods. Bioch. Analysis Vol. III, 97 (1956)
- (36) Jørgensen, S.: "Hypoxanthine and Xanthine Accumulated in Stored Human Blood: Determination of the Relative Amounts by Spektrophotometry". Acta Phar. Tox. 11, 265 (1955)

- (37) Steenstrup: "A note on Hyperuricemia during Labour".
Scand. J. clin. Inv. 12, 205 (1960)
- (38) Praetorius, E. und H. Poulsen: "Enzymatic Determination of Uric Acid".
Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 5, 273 (1953)

An dieser Stelle möchte ich all denen von ganzem Herzen danken, die meine Arbeit ermöglicht und mir dabei so vielfältig geholfen haben.

Mit besonderer Hochachtung möchte ich diesen Dank meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. N. Zöllner, gegenüber aussprechen. Seinem kritischen Rat und seiner väterlichen Zusprache danke ich die Überwindung so mancher Schwierigkeiten, die meine Geduld oftmals auf die Probe stellten. Seiner sicheren und zwanglosen Leitung gelang es, ein lebendiges Interesse an der biochemischen Forschung in mir zu erwecken und mich mit zahlreichen Methoden der modernen Biochemie vertraut zu machen.

Die angenehme menschliche und disziplinierte wissenschaftliche Atmosphäre im "Labor 390" empfand ich immer wieder wohltuend, sie ist nicht zuletzt durch die kluge Führung von Fräulein K. Kirsch bedingt. Fräulein Kirsch möchte ich herzlich für ihre zahllosen praktischen Hinweise und Einblicke in Gebiete, die nicht direkt mit meiner Arbeit in Verbindung standen, danken.

Meinen Dank möchte ich auch an die "Deutsche Forschungsgemeinschaft" aussprechen, die die Mittel für diese kostspielige Arbeit bereitwillig zur Verfügung gestellt hatte.

LEBENS LAUF

Am 5. September 1940 wurde ich , Ulrich Högg, in Stettin als 3. von 4 Kindern des Stadtbaurates Prof. Dr. Ing. Hans Högg und seiner Frau Gertrud, geb. Matthiesen, geboren.

Nach unserer Flucht 1945 lebten wir in Jesteburg, Kreis Harburg. Dezember 1950 siedelten wir nach München um, wo ich seitdem wohne.

Die Volksschule besuchte ich von Ostern 1947 bis Sommer 1951. September 1951 wurde ich in das Humanistische Maximiliansgymnasium, München, aufgenommen. Dort wurde mir nach 9 erfolgreichen Schuljahren, im Juli 1960, das Zeugnis der Reife ausgestellt.

Von November 1960 bis Juli 1966 habe ich insgesamt 12 Semester Medizin an der Universität München studiert. Im Februar 1963 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung mit der Note II.

Von Juli 1963 bis August 1964 habe ich vorwiegend an der vorliegenden Doktorarbeit gearbeitet.

Während meiner klinischen Ausbildung habe ich insgesamt 5½ Monate auf Abteilungen der Inneren Medizin, Pathologie und Psychiatrie famuliert.

Die Ärztliche Staatsprüfung habe ich am 19. Dezember 1966 mit der Gesamtnote I abgeschlossen.

